

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра цитологии и гистологии

Моршнева Алиса Васильевна

Модулирование ингибиторами гистоновых деацетилаз активности транскрипционных факторов FoxO

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Работа выполнена в
Лаборатории Молекулярных
Основ Дифференцировки Клеток
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института цитологии РАН (зав.
лаб. д.б.н., проф. В.А. Поспелов)
под руководством с.н.с., к.б.н. М.
В. Иготти

Научный руководитель:
к.б.н. Н.К. Галактионов

Заведующий кафедрой:
д.б.н. А.Д. Харазова

Санкт-Петербург

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
ОНКОГЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ.....	8
Онкогенная трансформация как метод получения модельных систем.....	8
Онкоген <i>E1A</i> аденовируса человека.....	9
Цитоплазматический онкоген <i>ras</i>	10
Гистоновая упаковка ДНК.....	11
Ацетилирование и деацетилирование гистонов.....	12
Ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDACi).....	13
ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ FOXO.....	14
Семейство белков Forkhead.....	14
Функции белков FoxO.....	15
Гены-мишени транскрипционных факторов FoxO.....	16
Регуляция экспрессии и активации FoxO.....	17
Посттрансляционные модификации FoxO.....	18
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	19
Клеточные линии и культивирование клеток.....	19
Выделение клеточных экстрактов.....	19
Фракционирование клеток.....	19
Диск-электрофорез белков по Laemmli.....	20
Иммуноблоттинг.....	20
Иммунофлуоресценция.....	21
Детектирование АФК.....	21
Выделение РНК.....	22
Обратная транскрипция.....	22
ОТ-ПЦР.....	22
Электрофоретическое разделение ДНК в агарозном геле.....	23
«Быстрая» трансфекция эукариотических клеток.....	23
Люциферазный анализ.....	24
Статистическая обработка полученных результатов.....	24
РЕЗУЛЬТАТЫ.....	25

Длительное действие бутирата натрия приводит к ингибированию экспрессии FoxO и накоплению АФК в E1A+Ras-трансформированных клетках	25
Бутират натрия не ингибирует экспрессию FoxO и не приводит к накоплению АФК в клетках с отрицательным статусом экспрессии E1A.....	26
Регуляция экспрессии FoxO ингибиторами HDAC имеет преимущественно посттранскрипционный характер	29
Под действием бутирата натрия в E1A+Ras-трансформированных клетках происходит перемещение FoxO в ядро	31
Обработка клеток ингибиторами гистоновых деацетилаз повышает трансактивирующую способность FoxO	33
Ингибиторы деацетилаз гистонов вызывают дополнительное накопление киназы PKB/Akt в E1A+Ras-трансформированных клетках	33
При длительном действии бутирата натрия происходит активация экспрессии генов-утилизаторов АФК.....	34
ОБСУЖДЕНИЕ	35
ВЫВОДЫ	37
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	38
БЛАГОДАРНОСТИ.....	44

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПААГ – полиакриламидный гель

ЭГТА – этиленгликоль тетрауксусная кислота

ЭДТА – этилендиамин тетрауксусная кислота

Amp – ампициллин, антибиотик

CBP – CREB-binding protein, белок, связывающий CREB

CDK – cyclin-dependent kinase, циклин-зависимая киназа

DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин

DDB1 – DNA damage-binding protein 1

DTT – дитиотреитол - низкомолекулярный восстанавливающий агент

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium – питательная среда для эукариот

ERK – Extracellular signal-regulated kinase – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами

FCS – Fetal Calf Serum – эмбриональная телячья сыворотка

FoxO – O-субсемейство FOX

GADD45 - growth arrest and DNA damage-inducible protein 45

HAT – Histone Acetyltransferase, гистоновая ацетилтрансфераза

HDAC – Histone Deacetylase, гистоновая деацетилаза

HDACi – ингибиторы гистоновых деацетилаз

HEPES 4 – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота

IKK – киназа IκB

JNK – c-Jun N-terminal kinase – киназа, фосфорилирующая c-Jun

LF – Липофектамин, трансфецирующий агент

МАР-киназа – митоген-активированная протеин-киназа

MEF – mouse embryonic fibroblast – эмбриональные фибробласты мышей

MEK=MAPKK – киназа митоген-активированной протеинкиназы

mERas – mouse E1A+Ras, линия клеток мыши, трансформированных онкогенами E1A и Ras

MnSOD – марганцевая супероксиддисмутаза

mTOR – mammalian target of rapamycin, белок-мишень рапамицина у млекопитающих

NaB – Бутират Натрия, ингибитор гистоновых деацетилаз

NAD – никотинамидадениндинуклеотид

NF-κB – nuclear factor κB – ядерный фактор, активирующий κB-промоторы

NP-40 - nonyl phenoхypolyethoxylethanol, детергент

p300 – E1A – связывающий белок 300

PA26 - p53-активируемый ген 26

PBS - Phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буфер

PKB/Akt – протеинкиназа B

PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride, фенилметилсульфонилфторид

pRB – Retinoblastoma protein, белок ретинобластомы

Prx3, 5 – пероксиредоксины 3 и 5

PVDF – поливинилиденфторид, материал мембраны

RIPA – radioimmunoprecipitation assay buffer, буфер для радиоиммунопреципитации

SAHA – субероиланилидгидроксамовая кислота, ингибитор гистоновых деацетилаз

SDS - sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрия

SIRT – silent information regulator 2, НАД-зависимая деацетилаза гистонов из семейства сиртуинов

TBS - Tris-buffered saline, трис-солевой буфер

Trx2 – тиоредоксин 2

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день для терапии раковых опухолей используется большое количество химических соединений с различным механизмом действия. Сочетание нескольких препаратов для достижения наибольшего терапевтического эффекта лежит в основе комбинированной терапии – одного из самых эффективных подходов к лечению рака. Однако, применение данного подхода требует глубокого понимания молекулярных механизмов действия того или иного препарата, так как терапия должна эффективно сдерживать рост и пролиферацию раковых клеток и быть при этом максимально безопасной для здоровых клеток.

Опухолевые клетки обладают особыми свойствами, отличающими их от нормальных клеток. Для них характерен неограниченный и независимый от внешних факторов рост, отсутствие чувствительности к негативным регуляторам пролиферации, блок программ апоптоза, нестабильный кариотип, а также способность к метастазированию.

Ингибиторы гистоновых деацетилаз способны останавливать пролиферацию опухолевых клеток в дозах, нетоксичных для нормальных клеток, что делает их перспективными терапевтическими агентами. Исследования влияния ингибиторов гистоновых деацетилаз на пролиферацию трансформированных клеток показали, что их применение вызывает остановку клеточного цикла, апоптоз, старение и/или дифференцировку. Однако механизмы, с помощью которых ингибиторы деацетилаз гистонов оказывают такой эффект на трансформированные клетки, пока еще до конца не выяснены. Помимо регуляции ацетилирования гистонов, гистоновые деацетилазы способны изменять уровень ацетилирования некоторых других субстратов, в том числе транскрипционных факторов, поэтому эффект, вызываемый ингибиторами деацетилаз гистонов, не сводится к активации транскрипции генов, обусловленной релаксацией хроматина.

Онкоген-трансформированные линии клеток являются удобными моделями для исследования механизмов действия терапевтических агентов. В лаборатории МОДК Института Цитологии выведена линия mERas – линия эмбриональных мышинных фибробластов (MEF), трансформированных комплементирующими онкогенами E1A аденовируса 5-го типа человека и cHa-ras, несущим активирующие точечные мутации в кодонах 12 и 61. Исследование клеток, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras, показало, что они обладают основными свойствами опухолевых клеток и не способны реализовывать блоки клеточного цикла в условиях сывороточного голодания, а также при воздействии факторов стресса и ДНК-повреждающих агентов (Поспелова и др., 1990).

Ранее было установлено, что ингибиторы деацетилаз гистонов вызывают в E1A+Ras-трансформированных клетках G1/S блок клеточного цикла и старение (Abramova et al., 2006;

Romanov et al., 2010). Данный эффект достигается при концентрациях бутирата натрия, нетоксичных для нормальных клеток. Этот факт способен сыграть важную роль в терапии раковых заболеваний, поэтому исследование его молекулярных механизмов имеет серьёзное практическое значение.

Описанные эффекты ингибиторов гистоновых деацетилаз связаны с процессами, в регуляцию которых вовлечены транскрипционные факторы FoxO – консервативные белки с широким спектром клеточных функций. Процессы пролиферации, апоптоза, окислительного стресса и старения контролируются генами-мишенями FoxO, что делает их интересным объектом исследования в рамках изучения механизма действия ингибиторов гистоновых деацетилаз в опухолевых клетках.

Целью работы является изучение влияния ингибиторов гистоновых деацетилаз на транскрипционные факторы семейства FoxO в трансформированных и опухолевых клетках в зависимости от экспрессии аденовирусного E1A. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить взаимосвязь между экспрессией FoxO и уровнем окислительного стресса при действии HDACi
2. Сравнить влияние ингибиторов деацетилаз гистонов на экспрессию FoxO в клетках с различным статусом E1A
3. Проанализировать активность белков FoxO при ингибировании деацетилаз гистонов в E1A-экспрессирующих и не экспрессирующих трансформированных клетках
4. Исследовать возможные механизмы модулирования экспрессии FoxO ингибиторами гистоновых деацетилаз в E1A+Ras трансформированных клетках

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ОНКОГЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Онкогенная трансформация как метод получения модельных систем

Основными особенностями раковых клеток являются их генетическая нестабильность, способность к неограниченной пролиферации, отсутствие контактного ингибирования и независимость от ростовых факторов. Нормальные клетки организма приобретают свойства раковых в процессе канцерогенеза, обусловленного накоплением отдельных генетических изменений. Возникновению таких изменений способствуют мутации в генах, чьи продукты вовлечены в регуляцию клеточной пролиферации, программируемой клеточной смерти или репарации поврежденной ДНК. В зависимости от роли в процессе канцерогенеза такие гены делят на две группы: опухолевые супрессоры, подавляющие клеточный рост, и протоонкогены (Alberts et al., 2002; Weinberg, 2013).

Мутировавший протоонкоген становится онкогеном и, комплементируя другие онкогены, участвует в запуске опухолевой трансформации. Комплементация онкогенов в данном случае необходима, так как было неоднократно показано, что одной мутации недостаточно для превращения клетки в раковую, так как полноценная опухолевая трансформация требует множества независимых генетических изменений. Так, первичная линия эмбриональных фибробластов крысы для полноценной трансформации нуждается, по крайней мере, в двух онкогенах. Одна группа онкогенов обеспечивает иммортализацию клеточной линии, тогда как другая необходима для создания трансформированного фенотипа (Wacker, 2016). Проведение онкогенной трансформации позволяет получить модельную систему, пригодную как для фундаментальных, так и для практических исследований. Так, онкоген-трансформированные клеточные линии могут быть использованы как для изучения сигнальных путей, принимающих участие в опухолевой трансформации, так и для терапевтических исследований, направленных на выявление механизма действия противоопухолевых препаратов.

В лаборатории молекулярных основ дифференцировки клеток (МОДК) Института Цитологии РАН была выведена линия клеток mERas. Это эмбриональные фибробласты мыши, трансформированные онкогеном E1A аденовируса человека и онкогенным cHa-ras. Линия является удобной моделью для изучения молекулярных механизмов опухолевой трансформации клеток.

Онкоген *E1A* аденовируса человека

Ген *E1A* раннего региона 5А аденовируса человека кодирует два различных белка, способных как к трансактивации, так и к репрессии генов, и является immortalizing ядерным онкогеном (Velcich and Ziff, 1988).

Immortalizing функция E1A состоит в E1A-индуцированном запуске клеточного цикла, который противостоит физиологическому старению, неизбежно наступающему в интактных клетках после определенного количества клеточных делений. В реализации этой функции и состоит вклад гена *E1A* в онкогенную трансформацию клеток (Berk, 2005). Показано также, что гены-мишени E1A кооперативно взаимодействуют с активированными Ras-генами, таким образом увеличивая эффективность онкогенной трансформации (Madhusudan et al., 2004).

Ключевой функцией E1A, как уже было сказано выше, является регуляция клеточного цикла. E1A способен стимулировать синтез ДНК, переводя клетки, находящиеся в фазе G0 или G1 в S-фазу (Berk, 1986). Воспроизведение аденовируса напрямую зависит от аппарата репликации хозяина, поэтому S-фаза является наиболее выгодной для реализации жизненного цикла вируса.

На молекулярном уровне индукция S-фазы и трансформация зависят от взаимодействия N-терминального домена E1A с белковыми комплексами клетки. Так, взаимодействие E1A с комплексом гистоновой ацетилтрансферазы p300 и CBP изменяет его ацетилтрансферазную активность, запуская клеточный цикл (Pelka et al., 2009). Запуск S-фазы происходит при взаимодействии E1A с белком ретинобластомы Rb, в результате которого из репрессорного комплекса Rb-HDAC высвобождается транскрипционный фактор E2F, индуцирующий S-фазу (Singhal et al., 2013).

Установлено, что конститутивная экспрессия E1A приводит к накоплению белка p53, который в зависимости от контекста вызывает в клетках либо блок клеточного цикла, либо p53-зависимый апоптоз (Lowe and Ruley, 1993). Одним из факторов, определяющих влияние белка p53 на дальнейшую судьбу клетки является экспрессия гена p21, являющегося ингибитором клеточного цикла (Seonane et al., 2002). E1A препятствует p53-индуцированной активации p21, следовательно единственным возможным ответом на накопление p53 в клетке становится апоптоз (Madhusudan et al., 2004).

Именно из-за индукции апоптоза в клетках E1A не способен к самостоятельной трансформации клеток и требует комплементации с другими онкогенами (*E1B/Ras*).

Цитоплазматический онкоген *ras*

Мутации онкогена *ras* обнаружены в 30% опухолей человека и ассоциированы с наиболее агрессивными летальными формами рака, такими как меланома, рак лёгких, прямой кишки и поджелудочной железы (Takashima and Faller, 2013).

Клетки млекопитающих экспрессируют три высоко консервативных гена семейства *ras*: *H-ras*, *K-ras* и *N-ras*. Ras-белки являются ГТФ-зами, функционирующими как молекулярные переключатели и переводящими внешние стимулы в сигнал внутриклеточных молекулярных каскадов, связывая клетку со средой. Сигнальные каскады, запускаемые Ras, участвуют в регуляции пролиферации, роста, клеточной миграции и выживания, поэтому конститутивная активность Ras часто приводит к неограниченной пролиферации и выживанию опухолевых клеток. Установлено, что онкогенный Ras напрямую активирует Raf/MEK/ERK-киназный каскад и в ответ на действие ростовых факторов стимулирует активность PI3-киназы – ключевого звена PI3/Akt/mTOR пути (Gille and Downward, 1999).

Аномальная активация Ras вызывается точечными мутациями в кодирующей области. Чаще всего это мутации в локусах 12, 13 и 61 (Prior et al., 2012). Все Ras-активирующие мутации работают по одному механизму, препятствуя гидролизу ГТФ, вызывающему в норме инактивацию Ras.

Практическое значение имеет антиапоптотическое действие Ras, позволяющее скомпенсировать проапоптотические сигналы других онкогенов. Подавление апоптоза осуществляется через активацию PI3/Akt пути, а также путем активации антиапоптотических генов *bcl-2* и *bcl-XL* (Kinoshita et al., 1995; Rosen et al., 2000). Таким образом, взаимодействие онкогенов *E1A* и *ras* позволяет избежать апоптоза и приводит к эффективной трансформации клеток.

ИНГИБИТОРЫ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Гистоновая упаковка ДНК

Гистоны, наряду с негистоновыми хромосомными белками, являются структурными белками хромосом и связываются с ядерной ДНК с образованием ДНК-белкового комплекса – хроматина. Комплекс ядерной ДНК с гистонами образует первый уровень организации хромосом, представленный нуклеосомами, состоящими из белкового коря и намотанной на него нити ДНК. Белковым кором нуклеосомы является октамер гистонов, включающий в себя пары белков семейств H2A, H2B, H3 и H4 (Davey et al., 2002). При этом, комплекс достаточно динамичен и взаимодействие ДНК с белками может усиливаться и ослабляться под действием различных факторов (Alberts et al., 2002).

Помимо структурной функции гистоны имеют также и функциональное значение, обеспечивая переход хроматина из неактивного состояния в активное и обратно. Несмотря на высокую консервативность аминокислотных последовательностей гистонов, они всё же имеют множество структурных вариантов, позволяющих гистонным белкам осуществлять генную регуляцию и эпигенетический сайленсинг. Гистоновые варианты и посттрансляционные модификации оказывают влияние на репликацию, транскрипцию и репарацию ДНК, регулируя доступность молекулы ДНК для транскрипционных факторов и ферментов (Mariño-Ramírez et al., 2005).

Связывание ДНК с гистоновым кором неспецифично и обусловлено ионными взаимодействиями между гистонами, богатыми положительно заряженными аминокислотами аргинином и лизином, и отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК (Davey et al., 2002). Положительно-заряженные аминокислоты сосредоточены преимущественно на N' и C'-концах молекул гистонов, не имеющих вторичной укладки – так называемых гистоновых хвостах. Во многом благодаря своей доступности, именно гистоновые хвосты чаще всего подвергаются посттрансляционным модификациям, что делает их ключевым звеном в эпигенетической регуляции работы генов (Bowman and Poirier, 2015; Kouzarides, 2018). Разнообразие механизмов модификации гистонов чрезвычайно широко: к ним относятся фосфорилирование сериновых остатков, метилирование лизиновых и аргининовых остатков, ацетилирование, деацетилирование, убиквитинилирование и сумоилирование лизиновых остатков и др. (Fischle et al., 2003), но в рамках исследования механизма действия ингибиторов деацетилаз гистонов наибольший интерес для нас представляют ацетилирование и деацетилирование.

Ацетилирование и деацетилирование гистонов

Как было упомянуто выше, ацетилированию и деацетилированию подвергаются преимущественно лизиновые остатки гистоновых хвостов. Ацетилирование приводит к ослаблению ионных взаимодействий гистонов и ДНК, так как при присоединении ацетил-S-коэнзима А с остатка лизина уходит положительный заряд, что приводит к локальной релаксации структуры нуклеосом и способствует процессу транскрипции. Установлено, что транскрипция проходит активнее при гиперацетилировании гистонов, при этом реже регистрируется «заикание» РНК-полимеразы (Protacio et al., 2000).

Присоединение и отщепление ацильного остатка осуществляют соответственно ацетилтрансферазы гистонов (HATs) и гистоновые деацетилазы (HDACs). Активация транскрипции, вызванная работой ацетилтрансфераз, может подавляться соответствующими деацетилазами, и многие случаи репрессии генов обусловлены именно деацетилированием гистонов (Seigneurin-Berny et al., 2001). Эти две группы ферментов являются важнейшими факторами эпигенетической регуляции, обеспечивая динамику структуры хроматина и осуществляя переключение между состояниями с различной активностью. Установлена связь между дерегуляцией этих ферментов и развитием раковых опухолей и некоторых других серьезных генетических заболеваний человека (Timmermann et al., 2001).

Деацетилазы гистонов могут быть разделены на два семейства: Zn^{+2} -зависимые, представленные гистоновыми деацетилазами первого (HDACs 1, 2, 3 и 8), второго (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 и 10) и четвертого (HDAC 11) классов, и Zn^{+2} -независимые, объединяющие HDACs третьего класса (SIRT) и требующие NAD для нормальной работы (Lane and Chabner, 2009).

Однако функции гистоновых деацетилаз не сводятся к деацетилированию гистонов. Более того, филогенетический анализ показал, что все четыре класса гистоновых деацетилаз предшествовали в своем развитии гистоновым белкам, что позволяет говорить о первичной негистоновой направленности HDACs (Gregorette et al., 2004). Ацетилирование негистоновых белков оказывает влияние на их функциональную активность, стабильность, а также на силу межбелковых взаимодействий. Негистоновые мишени деацетилаз гистонов являются участниками сигнальных путей, задействованных в регуляции пролиферации, дифференциации и клеточной смерти (Glozak et al., 2005). Таким образом, использование ингибиторов гистоновых деацетилаз позволяет не только повышать общую транскрипционную активность клетки за счет усиления ацетилирования гистонов, но и оказывать влияние на многие регуляторные молекулы и транскрипционные факторы.

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDACi)

Текущая классификация ингибиторов деацетилаз гистонов является структурной, так как ингибиторы деацетилаз гистонов очень разнородны по своей химической природе. Среди них встречаются низкомолекулярные жирные кислоты и их соли (бутират натрия, фенилбутират, вальпроевая кислота), гидроксамовые кислоты (SAHA, пироксамид, TSA), синтетические производные бензаминного ряда (MS-275 и CI-994), циклические тетрапептиды (депсипептид, трапоксин и апицидин), электрофильные кетоны (трифлуорометилкетон) и некоторые другие (Xu et al., 2007). Также HDACi можно также классифицировать по их специфичности. К неспецифичным ингибиторам гистоновых деацетилаз относят воринонстат (SAHA), панобинонстат, трихостатин А и др.; бутират натрия и вальпроевая кислота ингибируют гистоновые деацетилазы I и II классов, тубацин специфичен к HDAC6 (Khan and La Thangue, 2011).

Такие разные по своей химической природе вещества выполняют одну функцию благодаря наличию в их структуре общих элементов. Так, большинство изученных ингибиторов гистоновых деацетилаз включают следующие три компонента: сайт связывания цинка, линкер, мимикрирующий под боковую цепь остатка лизина, и кэп, перекрывающий вход в активный центр (Lane and Chabner, 2009).

Клеточный ответ на воздействие HDACi зависит от природы ингибитора, его концентрации, времени воздействия и, что немаловажно, состояния клетки. Кроме того, существуют различия в ответе на ингибиторы в разных типах клеток. В данной работе в качестве основного ингибитора деацетилаз гистонов используется бутират натрия (NaB) – натриевая соль бутановой (масляной) кислоты. Бутират натрия ингибирует первый класс гистоновых деацетилаз, конкурентно связываясь с цинком в активном центре фермента и блокируя поступление субстрата (Abou-Zeid et al. 2007). На различных клеточных линиях было показано проапоптотическое действие бутирата натрия, но в клетках E1A+Ras такой эффект не был выявлен. Вместо этого наблюдается необратимый блок клеточного цикла и старение (Abramova et al., 2006).

Установлено, что ингибиторы гистоновых деацетилаз могут влиять на экспрессию и работу только 2% генов в клетках млекопитающих, однако, среди них встречаются гены, вовлеченные в самые разные процессы, в том числе в образование и развитие опухолей. Это позволяет использовать HDACi в терапии рака в качестве противоопухолевых препаратов. Эффекты ингибиторов гистоновых деацетилаз в клетках разнообразны и обусловлены, как уже было сказано выше, разнообразием соответствующих функций деацетилаз гистонов.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ FOXO

Семейство белков Forkhead

Семейство транскрипционных факторов Fox или The forkhead box family – эволюционно древнее семейство генов, названное в честь гена *fkh* (от английского fork head или вильчатая голова), впервые описанного у *DAФKophila melanogaster*. Мутации в гене *fkh* вызывают дефекты в развитии головной складки в ходе эмбриогенеза, что приводит к характерному фенотипу «головы-вилки» у взрослых дрозофил (Weigel et al., 1989). Белки Fox возникли еще у одноклеточных эукариот и в результате многочисленных дупликаций образовали в ходе эволюции многочисленное семейство эукариотических транскрипционных факторов.

Общей чертой в строении всех белков семейства Fox является наличие высококонсервативного ДНК-связывающего домена FKH (Forkhead), состоящего примерно из ста аминокислотных остатков. Трёхмерная структура домена напоминает крылья бабочки, поэтому его называют также winged-helix или крыловидная спираль. Домен FKH состоит из трёх α -спиралей, трёх β -структур и двух «крыловидных» участков, фланкирующих третью β -структуру. Связывание белков Fox с ДНК происходит в мономерной форме, при этом непосредственно с последовательностью ДНК контактируют третья α -спираль и «крылья» ДНК-связывающего домена (Hannenhalli and Kaestner, 2009). Все белки Fox узнают консенсусную последовательность 5'-(G/C/A)(T/C/A)AAA(T/C)A-3', названную элементом ответа на белки Forkhead — Forkhead response element (FRE) (Feng Wang et al., 2015).

На основании различий в последовательности гены семейства Fox были разделены на субсемейства FoxA-FoxS. Гены *foxo* были впервые обнаружены в хромосомных перестройках некоторых опухолей у человека и получили свое название от английского слова «others» - другие (Greer and Brunet, 2005). В отличие от всех остальных субсемейств Fox, ДНК-связывающий домен белков FoxO несет уникальную инсерцию из пяти аминокислотных остатков (GDSNS), что делает эту группу белков наиболее дивергентной (Obsil and Obsilova, 2008). В субсемейство FoxO входят четыре транскрипционных фактора: FoxO1, FoxO3a, FoxO4, и FoxO6. Все его представители имеют различные, но перекрывающиеся профили экспрессии (Kaestner et al., 2000; Obsil & Obsilova, 2008).

Функции белков FoxO

Белки FoxO являются ключевым элементом многих сигнальных путей и в той или иной мере оказывают влияние на все наиболее значимые процессы в клетке — пролиферацию, дифференциацию, старение, выживание, клеточную смерть и многие другие. Некоторые из функций, выполняемых белками FoxO, антагонистичны. Это объясняется тем, что в зависимости от ткани и типа стимула функциональная активность FoxO может контролироваться по-разному. Кроме того, эксперименты с нокаутными по FoxO мышами показали, что каждый из генов *foxo* вносит уникальный вклад в физиологические процессы, несмотря на наличие большого количества перекрывающихся функций (M. Wang et al., 2009).

Работая как транскрипционные факторы, FoxO отвечают на различные внеклеточные и внутриклеточные сигналы, переводя их в специфические сигнальные каскады путём регуляции экспрессии генов-мишеней. Сигналами для этого субсемейства транскрипционных факторов могут быть факторы роста, нутриенты, инсулин, окислительный стресс и т.д. (Brunet, 2008).

Белки FoxO — известные опухолевые супрессоры. Эту функцию они реализуют, осуществляя блок клеточного цикла и участвуя в регуляции апоптоза. На мышах, нокаутированных по FoxO, было показано, что риск возникновения опухолей многократно возрастает в отсутствие белков FoxO (Hu et al., 2004; Paik et al., 2007).

Большое значение имеет антиоксидантная функция FoxO. Участие FoxO в борьбе с окислительным стрессом осуществляется также в нескольких направлениях: во-первых, FoxO непосредственно активирует экспрессию генов антиоксидантных белков, утилизирующих активные формы кислорода, а во-вторых принимает участие в репарации повреждённой активными формами кислорода ДНК (Greer and Brunet, 2005). Во многом с антиоксидантной функцией связывают положительный эффект, оказываемый FoxO на продолжительность жизни, так как старение клеток сопряжено с процессами окисления.

Белки FoxO оказывают влияние на процесс аутофагии. При этом, есть данные как о стимулирующем, так и о супрессирующем эффекте. Так, было показано, что деацетилирование FoxO1 деацетилазой SIRT1 индуцирует аутофагию в кардиомиоцитах (Hariharan et al., 2010), тогда как в раковых клетках простаты FoxO3 негативно регулирует аутофагию посредством ингибирования FoxO1 (Zhu et al., 2015).

Среди прочих функций FoxO можно отметить подавление ангиогенеза и ответ на гипоксию (Angelis et al., 2011; Shankar et al., 2008).

Гены-мишени транскрипционных факторов FoxO

Функции, выполняемые FoxO, напрямую связаны с регуляцией экспрессии соответствующих генов. Поэтому среди генов-мишеней FoxO встречаются гены-регуляторы клеточного цикла, проапоптотические гены, гены антиоксидантных белков и т.д. (Greer and Brunet, 2005). Ниже будут рассмотрены основные известные мишени транскрипционных факторов FoxO.

Антиоксидантная функция FoxO обеспечивается экспрессией таких генов как *mnsod*, *catalase*, *pa26*, *prx3*, *prx5*, *trx2*, тиоредоксинредуктаза 2 (*tr2*) и ген разобщающего белка 2 (*ucp-2*) (Olmos et al., 2013).

В процессе репарации ДНК задействованы белки GADD45 и DDB1. Установлено, что GADD45 осуществляет FoxO3-зависимую репарацию ДНК, так как репарация, активируемая FoxO3, значительно снижается в фибробластах с пониженной экспрессией *gadd45* (Tran et al., 2002).

С клеточной смертью связана экспрессия *bim-1* и *bnip3*, которые являются представителями семейства проапоптотических генов *bcl-2*, *bcl-6* – ингибитора *bcl-XL*, лиганда Fas, запускающего апоптоз через рецепторы смерти Fas, а также цитокина Trail, индуцирующего апоптоз в трансформированных и опухолевых клетках (Greer and Brunet, 2005).

Блок клеточного цикла G1/S осуществляется ингибиторами циклин-зависимых киназ $p21^{CIP1}$ и $p27^{KIP1}$, связывающимися с комплексами CDK2-циклин E и CDK4-циклин D, а также белком p130 из семейства белков ретинобластомы Rb, который ингибирует E2F4, влияя на регуляцию клеточного цикла. Блок G2/M осуществляется уже упоминавшимся выше белком репарации GADD45 и ингибирующим клеточный цикл циклином G2 (Huang and Tindall, 2007).

Некоторые мишени FoxO задействованы в метаболических процессах. Например, глюкозо-6-фосфатаза, осуществляет конвертацию глюкозо-6-фосфата в глюкозу, а PEPCK превращает оксалоацетат в фосфоенолпируват. Вклад в дифференцировку клеток вносят $p21^{CIP1}$ и антипролиферативный регулятор BTG1. Atrophin-1 участвует в процессе атрофии, являясь одной из четырех субъединиц E3 убиквитин-лигазного SCF комплекса. Также мишенью FoxO является белок LC3 — основной маркер аутофагии (Beharry et al., 2014).

Гены-мишени FoxO отличаются большим разнообразием, но функционально их можно поделить на три большие группы — гены антиоксидантной защиты и ответа на стресс, метаболические гены, гены клеточной смерти и пролиферации (Klotz et al., 2015).

Регуляция экспрессии и активации FoxO

Главным механизмом регуляции работы FoxO является ядерно-цитоплазматический транспорт. Секвестрирование FoxO в цитоплазме блокирует активность FoxO, ограничивая доступ транскрипционных факторов к генам-мишеням. Тем не менее, изменения в уровне экспрессии FoxO также вносят вклад в их регуляцию (Hwangbo et al., 2004). Эти изменения могут быть вызваны деградацией белков FoxO, модуляцией транскрипции или мутациями в генах *foxo*. При этом, смена локализации FoxO в клетке обратима, тогда как изменения уровня FoxO являются инструментом перманентной регуляции (Brunet, 2008).

Посттрансляционные модификации FoxO используются для тонкой настройки активности FoxO и ввиду их большого разнообразия рассмотрены в соответствующем разделе. Регуляция транскрипции генов *foxo* и стабильности их мРНК изучена гораздо меньше по сравнению с их посттрансляционными модификациями. Известно, что базальный уровень транскрипции *foxo1* и *foxo3* зависит от присутствия транскрипционного фактора E2F-1, напрямую связывающегося с промоторными областями генов FoxO и участвующего в регуляции клеточного цикла и запуске апоптоза (Nowak et al., 2007). Опухолевый супрессор p53 способен запускать транскрипцию FoxO в ответ на повреждение ДНК, что приводит к активации мишеней, задействованных в репарации ДНК (Klotz et al., 2015). Также показано, что транскрипция *foxo* может активироваться Доксорубицином – известным ингибитором топоизомеразы. Интересно, что сами FoxO могут участвовать в регуляции экспрессии генов своего семейства, оказывая ингибирующее действие на их транскрипцию (Klotz et al., 2015).

FoxO могут подвергаться деградации в протеасомах под действием инсулина или факторов роста. В значительной степени это связано с активацией киназы Akt. Активация инсулинового сигнального каскада приводит к секвестрированию белков FoxO в цитоплазме и их деградации, однако, точный механизм, обеспечивающий баланс между секвестрированием и деградацией еще не установлен. Предполагают, что кратковременная активация инсулинового каскада вызывает обратимое перемещение FoxO в цитоплазму, тогда как мощная или длительная активация приводит к убиквитин-зависимой деградации FoxO (Hu et al., 2004; Huang et al., 2005). Помимо инактивации через путь PI3/Akt, FoxO также могут инактивироваться в клетках опухолей по различным механизмам, включая ингибирование PTEN, микроРНК и ацетилирование p300 (Klotz & Jena, 2017).

Таким образом, уровень экспрессии и активности FoxO комплексно регулируется на всех уровнях.

Посттрансляционные модификации FoxO

Посттрансляционные модификации (ПТМ) – это ковалентные изменения, осуществляемые энзиматически после синтеза белка (Voet et al., 2013). Комбинацию ПТМ FoxO часто называют «кодом FoxO». Наиболее характерными модификациями этих белков являются фосфорилирование, ацетилирование и убиквитинирование, но также описано метилирование и О-гликозилирование. Большинство ПТМ происходит в ДНК-связывающем домене и влияет на трансаактивирующую способность FoxO (Voet et al., 2006).

Фосфорилирование чаще всего является негативным регулятором активности FoxO. Фосфорилирование киназой Akt открывает сайты связывания с шапероном 14-3-3, что приводит к ядерному экспорту FoxO и препятствует его обратному транспорту в ядро. Для реактивации FoxO должен быть дефосфорилирован, но при окислительном стрессе показан импорт pFoxO в ядро. Также инактивирующее фосфорилирование FoxO могут осуществлять киназы IKK, CDK2, ERK. При голодании происходит активация киназы AMPK, которая, фосфорилируя FoxO, усиливает их трансаактивирующую активность. Также активирующее действие оказывает киназа PERK, стимулирующая импорт FoxO в ядро (Klotz et al., 2015).

Ацетилирование в большинстве случаев ослабляет ДНК-связывающую способность FoxO, но при этом повышает их стабильность. Это связано с тем, что убиквитинирование, приводящее к деградации FoxO и ацетилирование являются конкурирующими модификациями и задействуют одни и те же сайты – остатки лизина (Wang et al., 2011). Установлено также, что ацетилирование FoxO активирует киназу Akt, что усиливает ингибирующий эффект. Однако ацетилирование по-разному влияет на связывание FoxO с различными промоторами, что делает эту модификацию промотор-специфичной. Основными регуляторами уровня ацетилирования FoxO являются ацетилазы CBP и p300 и деацетилаза Sirt1 (HDACiII). Ацетилаза CBP является также кофактором FoxO, стимулируя экспрессию генов-мишеней (Van et al., 2005). Показано, что E1A оказывает на CBP ингибирующее действие. Ферменты, участвующие в регуляции ацетилирования FoxO способны также регулировать ацетилирование гистонов. Поэтому уровень ацетилирования FoxO можно увеличить, ингибируя активность гистоновых деацетилаз.

Эффект убиквитинирования зависит от числа модифицированных сайтов. Моноубиквитинирование активирует импорт FoxO в ядро, тогда как полиубиквитинирование приводит к деградации FoxO. Это необратимый путь инактивации. Ингибирующее действие на убиквитинирование может оказывать гиперацетилирование FoxO и активность E1A.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и культивирование клеток.

В качестве модели популяции иммортализованных клеток была использована линия эмбриональных фибробластов мыши (MEF), трансформированных двумя комплементирующими онкогенами – онкогеном ядерного типа *E1A* раннего района аденовируса человека и цитоплазматическим онкогеном *cHa-ras*, несущим активирующие точечные мутации в кодонах 12 и 61. Эта линия выведена в лаборатории МОДК и названа mERas (mouse E1A +Ras).

Также в работе были использованы линии человеческих клеток: HEK293 (клетки эмбриональной почки, трансформированные аденовирусом 5 типа человека), HCT-116 (клетки опухоли прямой кишки) и A549 (клетки аденокарциномы лёгкого).

Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) с 10% FCS (Fetal Calf Serum) при 37 °C и 5% диоксида углерода. Для экспериментальных целей клетки обрабатывали ДНК-повреждающим агентом этопозидом (etoposide, 2,5 мкМ) и ингибиторами гистоновых деацетилаз — бутиратом натрия (4мМ NaB) или субериоланилидгидроксамовой кислотой (2,5 мкМ SANA).

Выделение клеточных экстрактов

Клетки на чашках промывали 2 раза раствором PBS, после чего снимали с чашек, собирали в микропробирку, осаждали центрифугированием (1,4 тыс. об./мин, 3 мин, 4⁰C) и удаляли супернатант. Для получения клеточных экстрактов осадки клеток лизировали в буфере, приготовленном на основе PBS, содержащего 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата натрия, 1 мМ PMSF, ингибиторы фосфатаз (1 мМ ортованадата натрия, 5 мМ EGTA, 5мМ фторида натрия) и коктейль ингибиторов протеаз. Лизис клеток проводили в течение 30 минут на льду, с периодическим интенсивным перемешиванием. Затем лизаты центрифугировали (14 тыс.об./мин, 10 мин, 4⁰C) и отбирали супернатант — клеточные экстракты. Концентрацию белка в экстрактах определяли спектрофотометрически по методу М. Брэдфорд при длине волны 595 нм . В пробах уравнивали количество белка по 40 мкг. Пробы кипятили с буфером для нанесения, замораживали на -20⁰C и хранили для последующего разделения с помощью электрофореза белков в геле с последующим переносом на мембрану и иммуноблоттингом.

Фракционирование клеток

Для получения ядерных экстрактов осадки клеток суспендировали в 400-500 мкл буфера, содержащего 10 мМ HEPES-KOH, pH 7.9, 0.1 мМ ЭДТА, 0.1 мМ ЭГТА, 1 мМ DTT,

0.6 % NP-40, 10 mM KCl, 1 mM PMSF с добавлением ингибиторов протеаз и ингибиторов фосфатаз (1 mM ортованадата натрия, 5 mM фторида натрия), инкубировали 15 мин на льду. Затем добавляли к пробам NP-40 до конечной концентрации 0.6 % и инкубировали на льду еще 5 мин, после чего центрифугировали 2 мин при 4⁰C, 5000 об/мин. Далее осадок ядер суспендировали в 50-200 мкл буфера, содержащего 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 0.6 M NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1 mM DTT, ингибиторы протеаз, 1 mM PMSF и ингибиторов фосфатаз (1 mM ортованадата натрия, 5 mM фторида натрия) и инкубировали 15 мин при 4⁰C с постоянным встряхиванием, затем центрифугировали 15 мин при 4⁰C, 13200 об/мин, отбирали супернатант – ядерные экстракты.

Диск-электрофорез белков по Laemmli

Разделение белков проводили с помощью денатурирующего диск-электрофореза по Laemmli в полиакриламидном геле (ПААГ) в вертикальной камере. Для этого использовали 5% концентрирующий гель (соотношение акриламид : метилен-бис-акриламид 50 : 1, pH 6.8) и 12.5%- разделяющий (соотношение акриламид : метилен-бис-акриламид 30 : 1, pH 8.8). Электрофорез проводили при постоянном электрическом токе 40 мА в вертикальном аппарате на 25 mM трис-глициновом буфере (pH 8.3) с 0.1% SDS. В качестве маркеров молекулярного веса использовали окрашенные белки с известными массами SeeBlue (Invitrogen). После разделения белки переносили из геля на PVDF мембрану в течение ночи при постоянном токе 100 мА и температуре 4⁰C в аппарате для влажного электропереноса для последующего иммуноблоттинга. Перенос осуществлялся в буфере, содержащем 25 mM трис, pH 8.3, 192 mM глицин, 0.1% SDS и 20% (V/V) метанола.

Иммуноблоттинг

После переноса белков мембраны отмывали 10 мин в буфере PBS. Для проверки качества переноса белки на мембране обратимо окрашивали в течение 5 мин 0.1% красителем Ponceau S, разведенном в 5% CH₃COOH. Затем мембраны отмывали 2 раза по 10 мин буфером TBST (трис-солевой буфер TBS - 0.2M Трис, pH 7.6, 1.37M NaCl - с 0.1% Tween20). Далее для неспецифической забивки мембраны в течение 1 часа инкубировали в 5% обезжиренном молоке, приготовленном на основе TBST и отмывали 3 раза по 5 мин буфером TBST. После этого инкубировали мембраны в течение 1 часа (или в течение ночи, на +4⁰C) с первыми антителами против интересующих белков, растворенными в минимальном объеме TBST, содержащем 5% обезжиренного молока или Бычьего Сывороточного Альбумина. Затем мембраны отмывали 3 раза по 5 мин в TBST и инкубировали 1 час в 5% молоке, приготовленном на TBST, содержащем соответствующие вторые антитела,

конъюгированные с пероксидазой хрена. После этого мембраны отмывали 3 раза по 5 мин в TBST. Далее белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции согласно инструкции фирмы-производителя (Thermo Scientific, USA) и анализировали с помощью системы гель-документации Syngene PXi6 Access.

В качестве специфических первых антител мы использовали антитела кролика против белка FoxO1 (Cell Signaling, USA), против киназы Akt и её фосфо-формы: Akt, pAkt Ser-473 (Cell Signaling, USA), а также антитела мыши против белка E1A (Santa Cruz, USA) и GAPDH (Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, фермент гликолиза как позитивный контроль, Invitrogen, USA). В качестве вторых антител использовали антитела кролика против иммуноглобулинов мыши (Rabbit-anti-mouse), либо антитела козы против иммуноглобулинов кролика (Goat-anti-rabbit) (Sigma, USA).

Иммунофлуоресценция

Клетки выращивали на покровных стёклах и затем фиксировали в 3,7% формалине в течение 15 минут при комнатной температуре, 10 минут промывали PBS и 15 минут 0.15 М раствором глицина. После фиксации клетки подвергались пермеабиллизации в 0.2% растворе Triton X-100 и блокированию в 3% BSA/PBS в течении 1.5 часов. Клетки инкубировали с первичными антителами к FoxO1 (Cell Signaling, USA), разведёнными в блокирующем буфере, при 4°C в течение ночи и после окрашивали вторичными антителами Goat-anti-Rabbit (GAR), конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor (488) 1 час при комнатной температуре. Препараты заключали с использованием ProLong Gold Antifade с ядерным красителем DAPI. Для анализа изображений использовали конфокальный лазерный микроскоп Olympus FV3000 (60x, zoom 2.5)

Детектирование АФК

Для выявления внутриклеточных активных форм кислорода использовали 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFDA). Данное соединение способно проникать через клеточную мембрану и после проникновения в клетку подвергается ацетилированию с образованием нефлуоресцентного соединения, которое, в свою очередь, окисляется активными формами кислорода с образованием 2',7'-дихлорфлуоресценина (DCF). Флуоресценция DCF регистрируется методами флуоресцентной спектроскопии. Клетки промывали PBS и инкубировали в 5мкМ DCFDA/PBS при 37°C в течение 20 минут. После инкубации клетки промывали теплым PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре Coulter Epicks XL (Bechman, USA) при длине волны возбуждения 488 нм.

Выделение РНК

Для выделения РНК в каждую чашку добавляли по 1 мл TRI Reagent Sigma (T9424) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Далее к лизату клеток добавляли 100 мкл 1-бром-3-хлор-пропана, перемешивали и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Пробы центрифугировали 15 минут на $+4^{\circ}\text{C}$ при 14000 оборотах в минуту для разделения фаз, после чего верхнюю водную фазу с растворённой РНК отбирали в стерильные пробирки. К водной фазе добавляли 500 мкл изопропанового спирта, перемешивали и инкубировали 10 минут для осаждения РНК, затем центрифугировали 10 минут при тех же условиях. После удаления супернатанта осадок РНК промывали 1 мл ледяного 75% этилового спирта и растворяли в небольшом количестве воды с ингибиторами РНК-з H₂O-DEPC. Для улучшения качества выделенной РНК проводили переосаждение с ацетатом натрия. Для этого объем разведенной в воде РНК довели до 350 мкл и затем добавляли CH₃COONa до конечной концентрации 0,25мМ и добавляли 1 мл 96% этилового спирта, после чего повторяли процедуру осаждения. Измерение концентрации РНК проводили спектрофотометрически с использованием прибора NanoDrop.

Обратная транскрипция

Для проведения реакции обратной транскрипции концентрации РНК выравнивали H₂O-DEPC до 3 нг, добавляли 0,2 мкг случайных праймеров из шести нуклеотидов (гексапраймеров). Пробы в течении 5 минут нагревали в термостате при $+65^{\circ}\text{C}$ для разрушения вторичной структуры РНК, после чего помещали пробки в лёд для предотвращения ренатурации. Далее добавляли смесь, содержащую буфер для обратной транскрипции, смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, ингибиторы РНК-з, обратную транскриптазу (200 единиц) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре, затем в течение часа нагревали пробки до $+42^{\circ}\text{C}$, после чего нагревом до $+70^{\circ}\text{C}$ 10 минут проводили терминацию реакции. После проведения реакции получили матрицу кДНК, на которой проводили реакцию ПЦР.

ОТ-ПЦР

Для оценки уровня транскрипции FoxO1 применяли метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Длина ПЦР-продукта составляет 388 пар нуклеотидов. Для проведения ПЦР-реакции готовили реакционную смесь, содержащую буфер для проведения реакции ПЦР, смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов в конечной концентрации 0.2 мМ, 2мМ хлорид магния, прямой и обратный праймеры в концентрации 10пМ с 5'-3'-последовательностями TACGGCCAATCCAGCATGAG и

AGCGGTTTCATGGCAGATGTG соответственно, Taq-полимеразу в концентрации 5 ед/мкл и 1 мкл кДНК-матрицы, полученной методом обратной транскрипции на матрице РНК. Все компоненты смешивали на льду, после чего проводили ПЦР-реакцию с использованием ПЦР-циклера Eppendorf. После двух минут первичной денатурации при 95°C пробы циклически нагревались по следующей схеме: 30 секунд денатурация (95°C), 30 секунд отжиг праймеров (58°C), 1 мин элонгация (72°C). Всего было проведено 30 циклов. Финальную элонгацию при 72°C проводили в течение 5 минут.

Для MnSOD использовали праймеры 5'-GCACTGAAGTTCAATGGTGG-3' 5'-ACTGAAGGTAGTAAGCGTGCTC-3' с температурой отжига 55°C и 2мМ концентрацией MgCl₂.

Электрофоретическое разделение ДНК в агарозном геле

Разделение нуклеиновых кислот проводилось в горизонтальном аппарате при напряжении 60В в 1% агарозном геле на электрофорезном буфере (40 мМ трис, 5 мМ CH₃COONa, 1 мМ EDTA, pH 7.8) с бромистым этидием (0.5 мкг/мл). После электрофореза ДНК в геле была окрашена в растворе бромистого этидия в течение 10 мин. Анализ проводился на приборе Syngene PXi6 Access.

«Быстрая» трансфекция эукариотических клеток

В данном методе трансфекция клеток производится одновременно с рассевом на плату. В 10 мкл среды OPTI-MEM без сыворотки было добавлено 0.1 мкг ДНК вектора интереса (плазмида FHRE-luc) и 0.002 мкг ДНК вектора pRL, кодирующего люциферазу из *Renilla reniformis* (контроль трансфекции) для каждой лунки. В отдельной микропробирке была приготовлена смесь липофектамина LF 2000 (Invitrogen) – 0,2 мкл LF 2000 и 10 мкл среды OPTI-MEM для каждой лунки. Инкубация проводилась в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее разведенная ранее в среде OPTI-MEM ДНК объединялась с раствором LF 2000 с последующей инкубацией в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем к смеси было добавлено 660 мкл среды OPTI-MEM. В каждую лунку было добавлено 50 мкл комплекса ДНК-LF 2000. Клетки были суспендированы в среде DMEM с 10% FCS без антибиотика в концентрации $100 * 10^4$ клеток на мл ($100 * 10^3$ на каждую лунку). Концентрация клеток была определена с использованием камеры Горяева. В лунки с трансфекционной смесью добавлялось по 100 мкл клеточной суспензии, инкубация проводилась при температуре 37°C и 5% CO₂. Действующие агенты были добавлены через 24ч после трансфекции.

Люциферазный анализ

Клетки на плате промывали раствором PBS, после чего раствор был тщательно отобран из лунок. Затем клетки были лизированы в 15 мкл лизирующего буфера из набора для проведения двойного люциферазного анализа (Dual-Luciferase Reporter Assay System, фирмы Promega, USA) в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее лизаты клеток были отобраны в микропробирки и центрифугированы в течение 15 мин, 12000 об/мин при комнатной температуре. Методом Брэдфорда была измерена концентрация белка в полученных экстрактах, после чего пробы были выровнены по белку. К 5 мкл экстракта было добавлено 15 мкл раствора, содержащего люциферин (Promega, USA) – субстрат для люциферазы. Измерение проводили на люминометре TD-20/20 (Turner Designs), после чего к измеренной пробе добавлялось 15 мкл буфера Stop&Glo, ингибирующего активность люциферазы и содержащего субстрат для люциферазы из *Renilla reniformis*, и проводили повторное измерение.

Статистическая обработка полученных результатов

Для статистической обработки полученных результатов использовали программу STATISTICA 10 (StatSoft ©). Для результатов нескольких независимых опытов рассчитывали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий между опытом и контролем определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Длительное действие бутирата натрия приводит к ингибированию экспрессии FoxO и накоплению АФК в E1A+Ras-трансформированных клетках

Для того, чтобы исследовать корреляцию между уровнем окислительного стресса при действии ингибиторов гистоновых деацетилаз и экспрессией транскрипционных факторов FoxO в E1A+Ras-трансформированных клетках, обработанные соответствующими агентами клетки снимали с чашек и делили для дальнейшего анализа количества белка методом иммуноблотинга и содержания активных форм кислорода (АФК) по окислению деривата DCFDA до флюоресцирующего соединения. Известно, что ДНК-повреждающие агенты усиливают продукцию активных форм кислорода, поэтому в эксперименте в качестве положительного контроля был использован этопозид, что позволило оценить уровень FoxO в условиях повышенного формирования АФК. Этопозид – цитотоксический агент, приводящий к повреждениям ДНК посредством ингибирования активности топоизомеразы II (Oh et al., 2007).

Согласно данным, представленным на рис.1, кратковременное действие бутирата натрия стимулирует экспрессию FoxO1 и не сопровождается накоплением активных форм кислорода, тогда как этопозид, наоборот, стимулирует накопление АФК и снижает количество FoxO. Для оценки пролонгированного действия ингибитора HDAC на динамику накопления АФК и экспрессию FoxO клетки обрабатывали бутиратом натрия в течение 48-72 часов. Как показано методом иммуноблотинга, через 48 часов действия NaB уровень FoxO1 начинает стремительно падать, становясь практически недетектируемым через 72 часа (рис. 2а). Параллельно с этими событиями, через 48 ч наблюдается значительное увеличение внутриклеточного содержания активных форм кислорода (рис. 2б). Содержание АФК увеличивается примерно в три раза по сравнению с контрольной точкой (рис.2б).

Мы установили, что при длительном действии бутирата натрия в E1A+Ras-трансформированных клетках прослеживается тенденция к деградации FoxO1, сопровождаемая нарастанием количества активных форм кислорода. Таким образом, накопление АФК и уровень белка FoxO1 находятся в обратно пропорциональной зависимости.

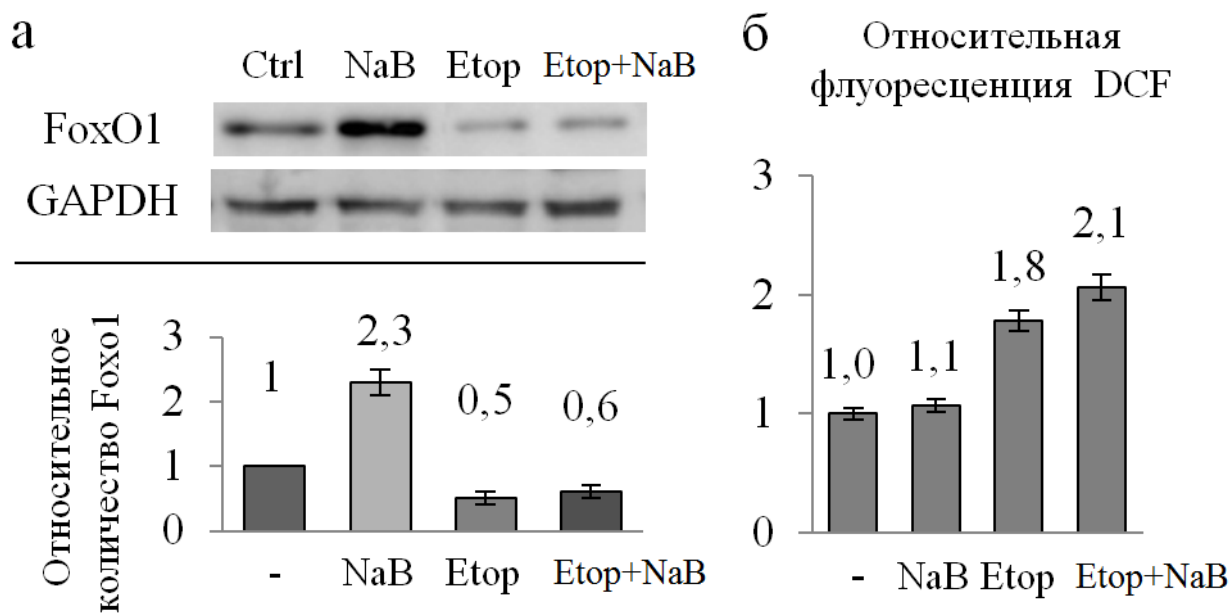


Рис.1 E1A+Ras-трансформированные клетки в течение 24 часов обрабатывали этопозидом и бутиратом натрия отдельно и в комбинации. Детектируемое методом иммуноблоттинга количество белка FoxO1 было наименьшим в клетках, обработка которых включала этопозид, (рис.1а), и увеличенным в обработанных NaB клетках. При этом содержание активных форм кислорода не возрастает в E1A+Ras-трансформированных клетках после 24 часов действия бутирата натрия (рис. 1б), что может быть объяснено накоплением белка FoxO (рис.1а), тогда как действие этопозидов приводит к выраженному накоплению АФК.

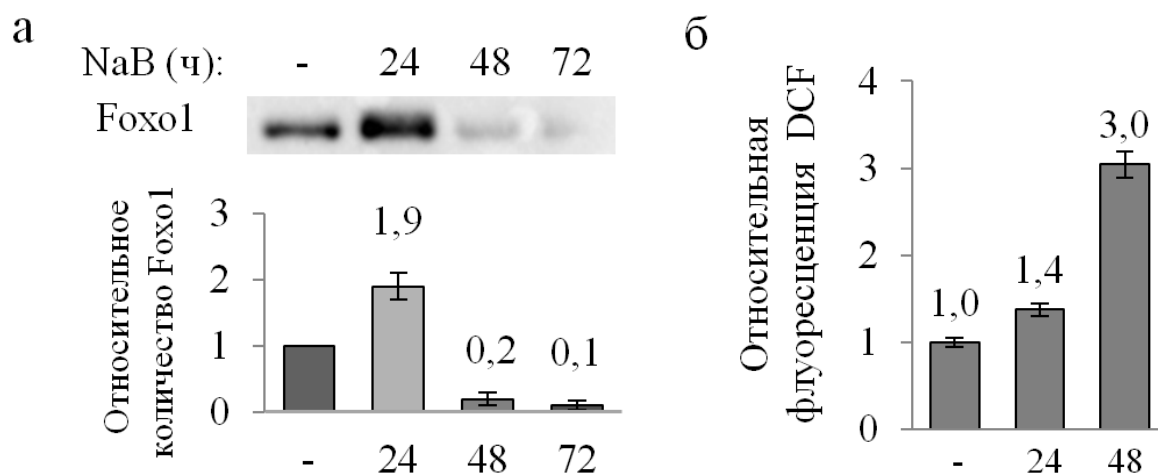
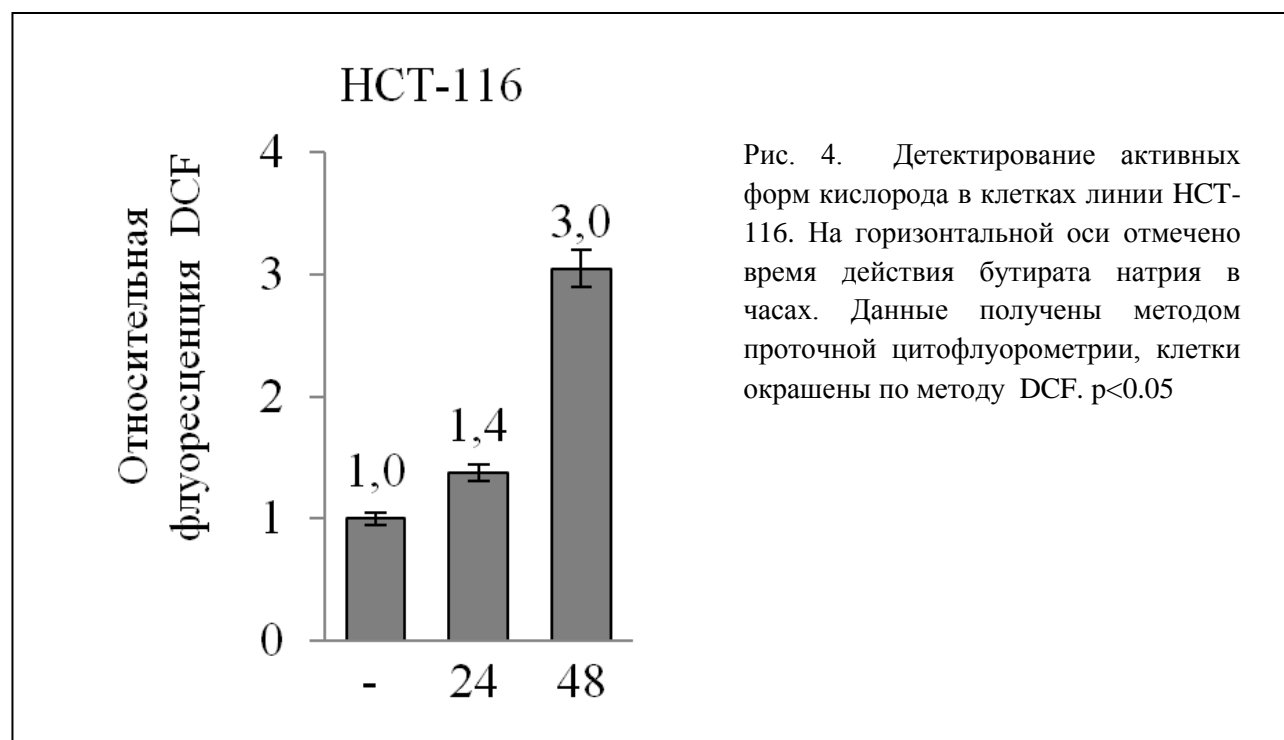
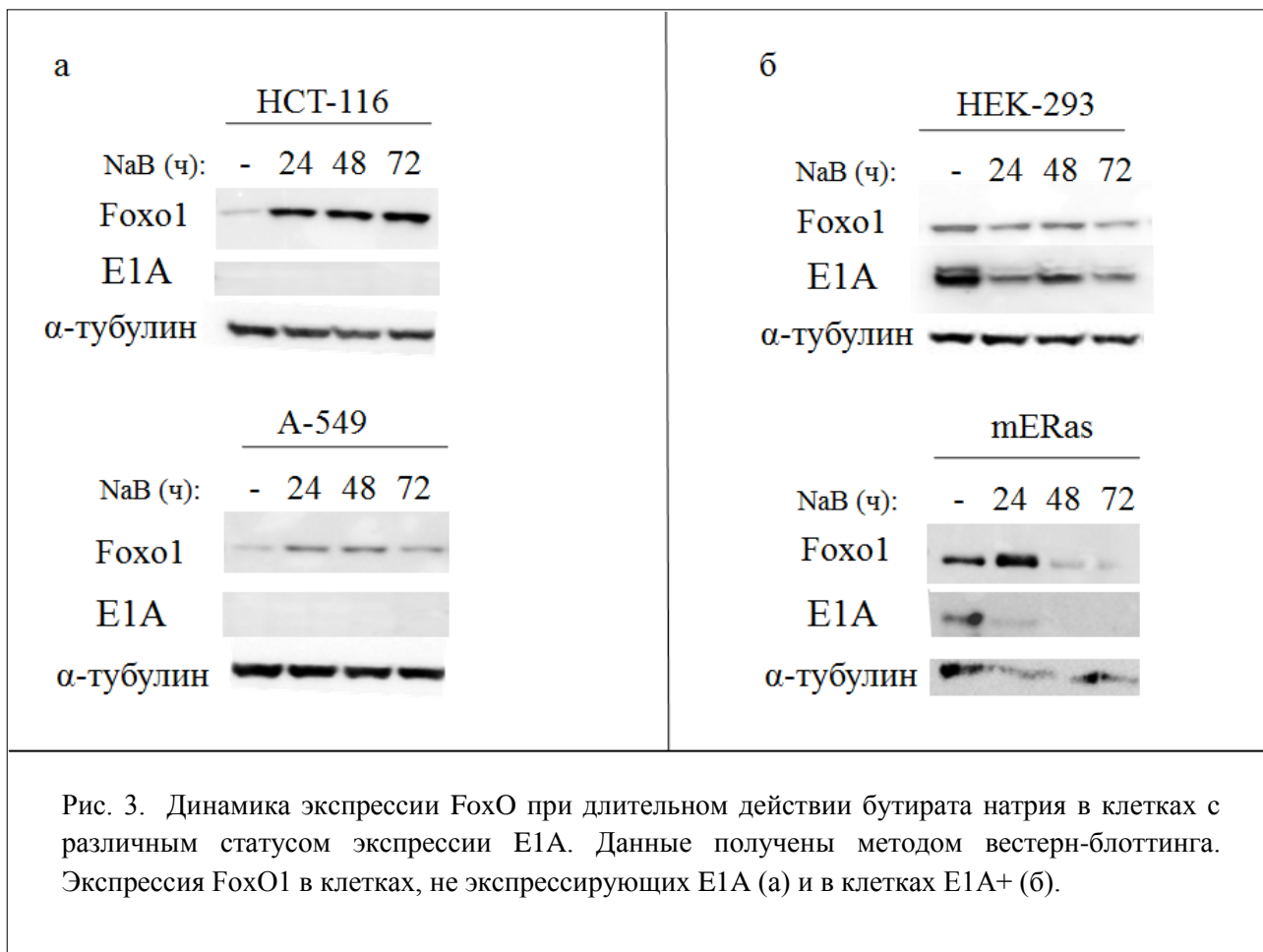


Рис. 2. Динамика экспрессии FoxO и накопления АФК в ответ на длительное действие бутирата натрия (4мМ) на E1A+Ras трансформированные клетки. Контрольные точки инкубировали в течение 24 часов без добавления NaB. а) Оценка уровня экспрессии FoxO1. На гистограмме представлена интенсивность полос относительно контроля, принятого за единицу (-). б) Уровень АФК, измеренный методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания DCFDA. На горизонтальной оси отмечено время действия бутирата натрия в часах. $p < 0.05$

Бутират натрия не ингибирует экспрессию FoxO и не приводит к накоплению АФК в клетках с отрицательным статусом экспрессии E1A

Для того, чтобы установить, является ли наблюдаемый эффект ингибиторов HDAC на FoxO универсальным для всех опухолевых клеточных линий или специфичным для E1A+Ras трансформантов, мы исследовали экспрессию FoxO при действии ингибиторов HDAC в человеческих опухолевых линиях, содержащих мутации *ras* (карцинома кишечника HCT-116 и карцинома легкого A-549), или экспрессирующих E1A (HEK-293). В не экспрессирующих E1A линиях клеток HCT-116 и A-549 при длительном действии бутирата натрия FoxO показывает совершенно другую динамику экспрессии. В клетках с отрицательным статусом E1A базальный уровень FoxO1 значительно ниже, чем в E1A-экспрессирующих клетках (рис. 3), при этом NaB индуцирует накопление FoxO1 (рис.3а). Деградации FoxO, которая наблюдается в E1A+Ras-трансформированных клетках при длительном действии бутирата натрия (рис.3б), не происходит. Экспрессия FoxO в эмбриональных клетках почки человека, трансформированных аденоврусом 5 типа, HEK-293 сходна с картиной экспрессии в исследуемых E1A+Ras-трансформированных клетках. Высокий начальный уровень экспрессии не увеличивается при действии NaB (рис. 3б). Так же как E1A+Ras-трансформированные клетки, клетки линии HEK-293 экспрессируют E1A, однако, *ras* у них не мутантный и в этом их важное отличие. Экспрессия E1A обеспечивает высокий базальный уровень Foxo, и при этом в отсутствие мутантного *ras* не происходит деградации Foxo при действии бутирата натрия.

Для проверки окислительного статуса в клетках со стабильной экспрессией FoxO проводили регистрацию уровня активных форм DCF клетках линии HCT-116 методом проточной цитофлуориметрии. Анализ показал, что накопления АФК в клетках со стабильной экспрессией бутиратом натрия не происходит (рис.4).



Регуляция экспрессии FoxO ингибиторами HDAC имеет преимущественно посттранскрипционный характер

Для выявления уровня, на котором происходит регуляция экспрессии FoxO бутиратом натрия, была проведена оценка уровня матричной РНК FoxO1 методом ОТ-ПЦР. Согласно полученным результатам, бутират натрия не вызывает значительного снижения содержания мРНК (Рис.5а). Следовательно, бутират натрия не оказывает ингибирующего действия на транскрипционный уровень экспрессии FoxO вплоть до 72 часов. В то же время, уровни белков FoxO1 и FoxO3 значительно снижаются при действии бутирата натрия. При этом, характер действия бутирата натрия различен для FoxO1 и FoxO3: уровень FoxO3 снижается равномерно по мере увеличения времени действия NaB, характерного для FoxO1 пика экспрессии на 24 часах не наблюдается (Рис. 5б).

Снижение уровня FoxO чаще всего обусловлено инактивирующим фосфорилированием FoxO, приводящим к его деградации. Для установления вклада этого механизма в NaB-зависимую деградацию FoxO проводили вестерн-блоттинг с использованием антител к фосфорилированной форме FoxO3. По результатам блоттинга, фосфорилированная форма FoxO3 начинает активно накапливаться на 48 часах действия бутирата натрия (Рис.5с).

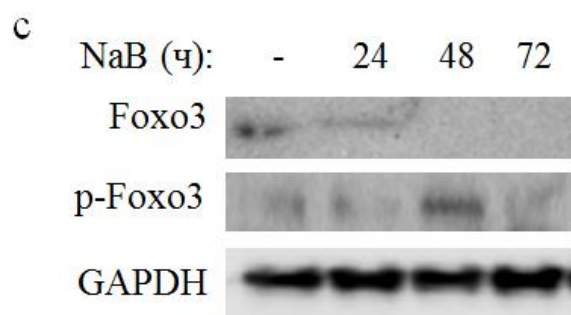
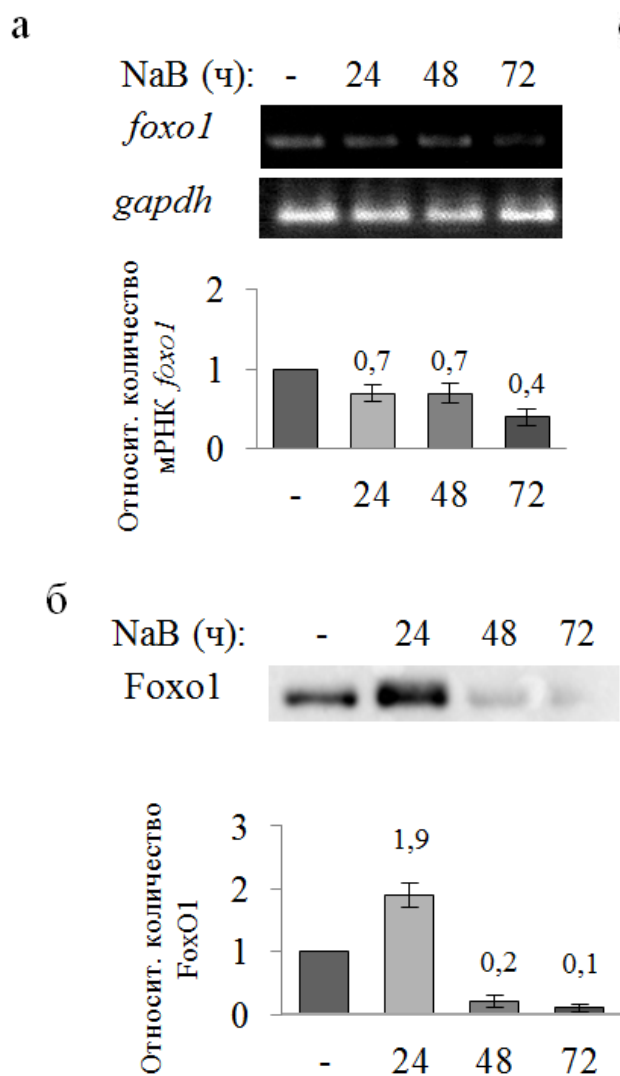


Рис. 5. Действие бутирата натрия на экспрессию FoxO на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Клетки были обработаны 4мМ NaB. Для контрольной точки (-) были взяты клетки, не подвергавшиеся действию бутирата натрия. а) ОТ-ПЦР анализ транскрипции *foxo1*. В качестве контроля качества кДНК-матрицы использовали ОТ-ПЦР гена домашнего хозяйства *gapdh*. Гистограмма отображает подсчет интенсивности ПЦР-полос относительно контроля (-). б) Иммуноблоттинг тотальных клеточных экстрактов E1A+Ras-трансформированных клеток с использованием антител к FoxO1. с) Иммуноблоттинг с антителами к FoxO3 и его фосфорилированной форме.

Под действием бутирата натрия в E1A+Ras-трансформированных клетках происходит перемещение FoxO в ядро

Согласно данным, полученным методом иммуноблоттинга на ядерных и цитоплазматических экстрактах, FoxO1 равномерно распределён между ядром и цитоплазмой в контрольных клетках, не подвергавшихся обработке бутиратом натрия. (Рис.6).

При длительном действии бутирата натрия FoxO1 выявляется только в ядерных экстрактах, где остаётся стабильным до 48 часов. Для цитоплазматического FoxO1 характерен пик на 24 часах действия бутирата натрия, после чего уровень FoxO значительно снижается, что повторяет динамику FoxO1, полученную на тотальных экстрактах (рис. 2а). Просуммировав полученные результаты, можно сказать, что тотальный уровень FoxO1 в ходе обработки бутиратом натрия E1A+Ras-трансформированных клеток падает с почти полным исчезновением цитоплазматической формы FoxO1, тогда как ядерная форма FoxO1 поддерживается на относительно стабильном уровне.

Локализация FoxO1 также была выявлена методом иммунофлуоресцентной микроскопии. На полученных микрофотографиях видно, что в контрольных клетках флуоресценция FoxO в ядре слабее, чем в цитоплазме – видим менее интенсивно прокрашенные области ядер. Затем при действии бутирата натрия происходит увеличение флуоресценции FoxO в ядре, при этом значительное повышение уровня ядерного FoxO1 наблюдается на 48 часах действия NaB (рис. 7).

Суммируя результаты иммуноблоттинга и иммунофлуоресценции, можно сказать, что при длительном действии бутирата натрия происходят изменения в ядерно-цитоплазматическом соотношении FoxO. При 48 часах действия NaB FoxO1 представлен преимущественно в ядерной фракции.

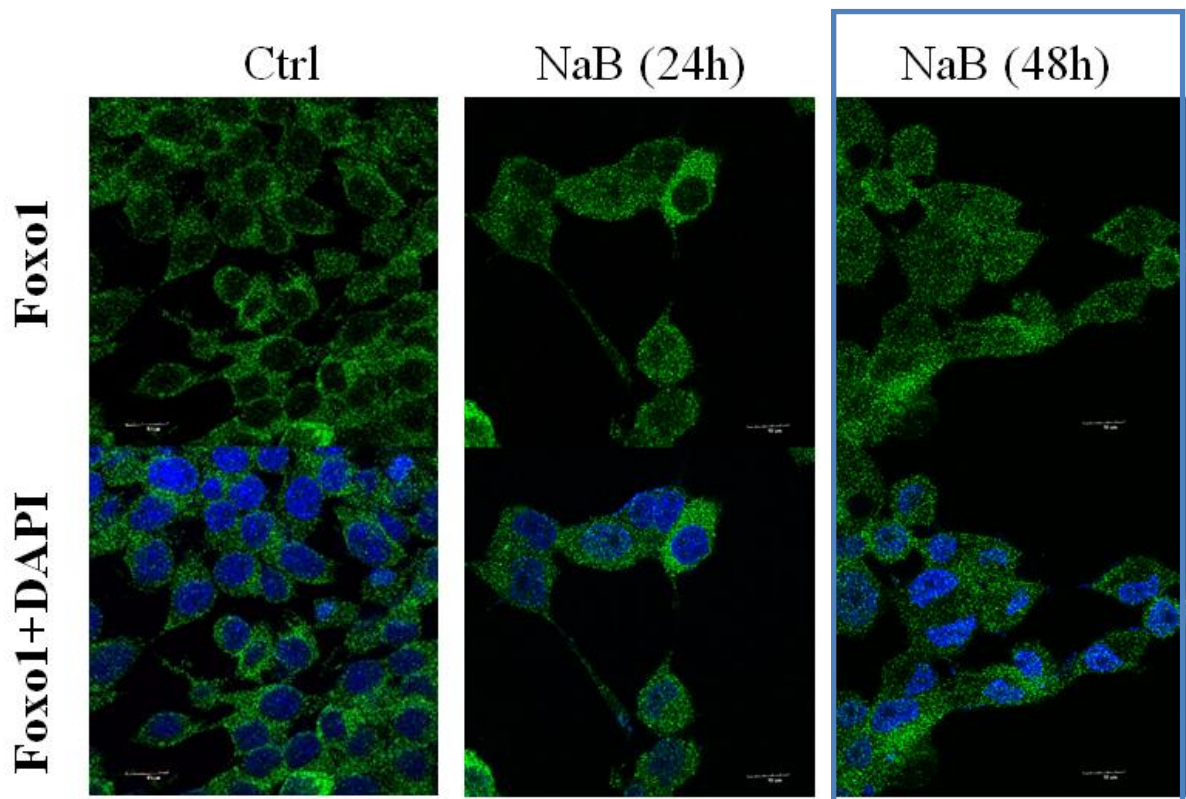


Рис. 7. Влияние бутирата натрия на клеточную локализацию FoxO1 в E1A+Ras-трансформированных клетках. Иммунофлуоресцентный анализ локализации FoxO1. Синей рамкой отмечен момент активного ядерного импорта FoxO.

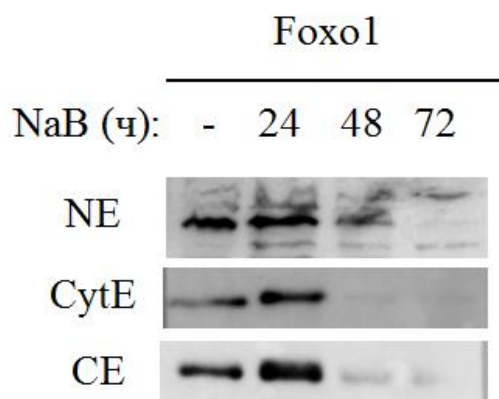


Рис. 6. Оценка изменения локализации FoxO1 в ходе обработки бутиратом натрия(4мМ) методом иммуноблоттинга с использованием ядерных (NE), цитоплазматических (CytE) и тотальных (CE) экстрактов. Для контрольной точки(-) были взяты не обработанные NaB клетки.

Обработка клеток ингибиторами гистоновых деацетилаз повышает трансактивирующую способность FoxO

Для оценки трансактивирующей способности FoxO клетки были трансфицированы плазмидой FHRE-luc, несущей репортерный ген люциферазы под FoxO-активируемым промотором. Далее методом люциферазного анализа оценивали способность FoxO запускать транскрипцию гена-репортера при продолжительном действии HDACi в клетках mERas и НСТ-116. Для обеих линий показано мощное активирующее действие ингибиторов деацетилаз гистонов, однако, временная динамика активности у них различна. Полученные результаты согласуются с данными вестерн-блоттинга по общей динамике FoxO1 (рис.3) Для клеток mERas характерен пик активности после 24 часов действия HDACi, после чего активность люциферазы значительно снижается, оставаясь, впрочем, на довольно высоком уровне (рис.8а).

В клетках линии НСТ-116 интенсивность сигнала люциферазы продолжает нарастать после 24 часов действия бутирата натрия, тенденции к снижению активности не наблюдается (рис.8б)

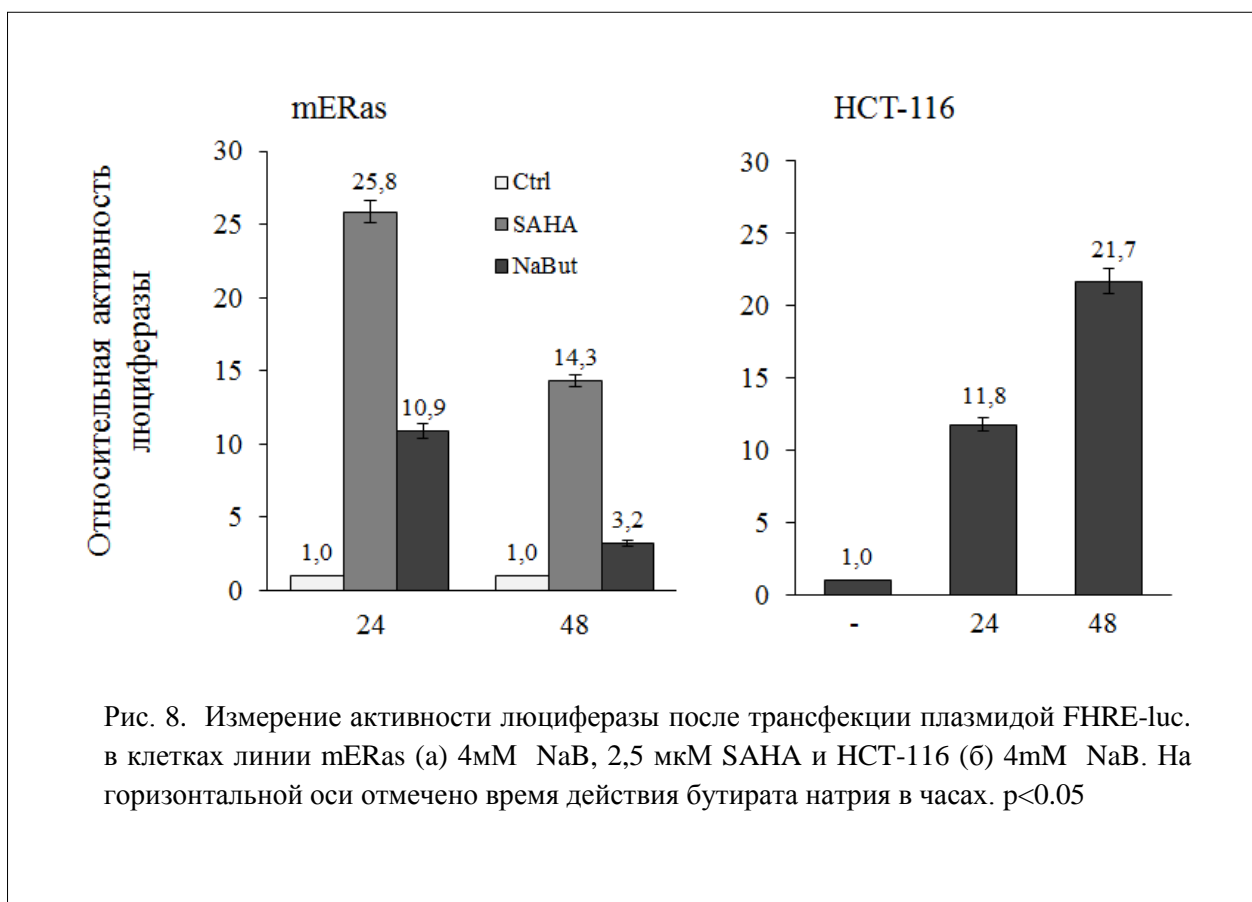


Рис. 8. Измерение активности люциферазы после трансфекции плазмидой FHRE-luc. в клетках линии mERas (а) 4mM NaB, 2,5 мкM SAHA и НСТ-116 (б) 4mM NaB. На горизонтальной оси отмечено время действия бутирата натрия в часах. $p < 0.05$

Ингибиторы деацетилаз гистонов вызывают дополнительное накопление киназы PKB/Akt в E1A+Ras-трансформированных клетках

Киназа PKB/Akt играет значительную роль в деградации FoxO, участвуя в инактивирующем фосфорилировании FoxO и их экспорту из ядра с последующей деградацией в протеасомах (Huang and Tindall, 2007). Для установления вклада pAkt-опосредованного фосфорилирования в HDACi-зависимой деградации FoxO проводили оценку динамики экспрессии pAkt в E1A+Ras-трансформированных клетках при действии HDACi, для чего был использован метод иммуноблоттинга. Для бутирата натрия было показано накопление фосфорилированной формы Akt (рис.9). Накопление pAkt происходит также и при действии других ингибиторов деацетилаз гистонов, например TSA.

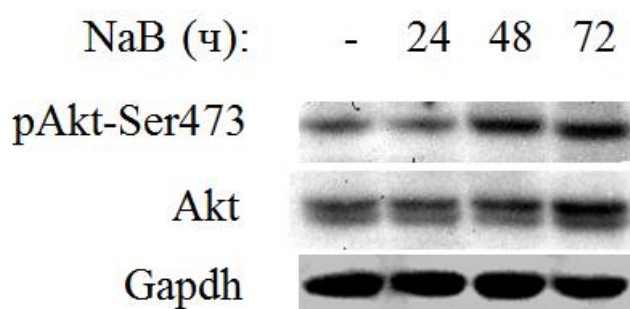


Рис. 9. NaB-опосредованное накопление фосфорилированной формы киназы Akt в E1A+Ras-трансформированных клетках.

При длительном действии бутирата натрия происходит активация экспрессии генов-утилизаторов АФК

Гены, кодирующие белки-скавенджеры активных форм кислорода являются мишенями FoxO. Однако методом ОТ-ПЦР было показано, что несмотря на деградацию FoxO, при действии бутирата натрия происходит стойкая активация экспрессии марганцевой супероксиддисмутазы *mnsod* (рис. 10). Данный результат может объясняться активацией заместительных механизмов и подробнее рассматривается в разделе «Обсуждение».



Рис. 10. NaB-опосредованная активация экспрессии *mnsod* в E1A+Ras-трансформированных клетках. ОТ-ПЦР на актин используется в качестве контроля качества кДНК-матрицы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибиторы HDAC изменяют экспрессию генов, действуя отчасти через ингибирование деацетилаз гистонов (Sealy and Chalkley, 1978). Нами было показано, что ингибиторы гистоновых деацетилаз способны при длительном действии стимулировать активирующее фосфорилирование PKB/Akt, однако, точный механизм HDACi-зависимой активации киназы Akt еще предстоит установить, так как активация PKB/Akt может быть следствием HDACi-опосредованной активации как непосредственно киназы, активирующей Akt, так и любого из вышестоящих элементов данного сигнального пути. Известно, что конститутивная активность PKB/Akt является одной из причин ингибирования FoxO, например при развитии опухолей (Klotz et al., 2015). Это объясняет тот факт, что базальный уровень экспрессии FoxO в контрольных E1A+Ras-трансформированных клетках mERas изначально более низкий по сравнению с оригинальной линией эмбриональных фибробластов MEF, трансформацией которой она была получена. Так, во всех рассмотренных клеточных линиях ввиду гиперэкспрессии Ras киназа PKB/Akt конститутивно активна, поэтому бутират натрия вызывает лишь добавочную активацию данной киназы.

Изначально бутират натрия оказывает стимулирующее действие на экспрессию FoxO1 в E1A+Ras-трансформированных клетках, но с увеличением времени воздействия происходит деградация FoxO, опосредованная возрастанием экспрессии и фосфорилированием киназы PKB/Akt. Эта первоначальная активация может быть объяснена увеличением содержания активных форм кислорода, стимулирующих экспрессию FoxO1 и реализацию его антиоксидантной функции, тогда как накопление pAkt сдерживает дальнейшее нарастание уровня экспрессии FoxO1, приводя затем к практически полной его деградации. При этом, показано, что само увеличение уровня экспрессии Akt является АФК-опосредованным (Klotz et al., 2015), что объясняет отсутствие ингибирования FoxO в клеточных линиях, в которых не происходит накопления АФК при действии бутирата натрия. Кроме того, окислительный стресс может индуцировать посттрансляционные модификации FoxO. Так, при накоплении активных форм кислорода усиливается активность ацетилаз, оказывающих ингибирующее действие на активность FoxO (Brunet et al., 2004).

В некоторых работах показано, что MnSOD регулируется напрямую через FoxO3a (Fallarino et al., 2004; Lu et al., 2013), но некоторые авторы считают FoxO1 ключевым регулятором экспрессии MnSOD (Yang et al., 2014). Таким образом, активация транскрипции генов-утилизаторов АФК в первые часы действия бутирата натрия может быть объяснена активацией FoxO в ответ на появление активных форм кислорода. Однако дальнейшее возрастание уровня экспрессии MnSOD не может быть FoxO-зависимым, так как FoxO в это

время подвергаются Akt-опосредованной деградации. Интересно, что сама киназа PKB/Akt может быть одной из причин столь ярко выраженного накопления скавенджеров АФК, так как сигнальный путь PI3K/Akt активирует NF-κB – универсальный транскрипционный фактор, способный индуцировать экспрессию MnSOD (Morgan and Liu, 2010). Следовательно, антиоксидантная защита в клетках не снимается с деградацией FoxO, так как NF-κB также способен активировать транскрипцию генов-утилизаторов АФК.

Показано, что в трансфецированных фибробластах и линиях раковых клеток человека экспрессия гена E1A может вызывать сенситизацию к ряду соединений с противоопухолевой активностью, включая ингибиторы деацетилаз гистонов (Su et al., 2011). Нами было установлено, что статус экспрессии E1A серьезно влияет на уровень экспрессии и динамику активности FoxO. В не экспрессирующих E1A клетках более низкий по сравнению с клетками E1A+ базальный уровень FoxO стабильно возрастает при действии HDACi. Это может быть связано с отсутствием АФК-индуцированного аккумуляирования киназы Akt, так как в данных клеточных линиях накопления активных форм кислорода не происходит. Подтверждение отсутствия накопления киназы PKB/Akt в ходе обработки ингибиторами деацетилаз гистонов клеток, не экспрессирующих E1A, является темой для дальнейших исследований. Разницу в базальном уровне экспрессии FoxO можно объяснить стабилизирующим действием E1A, которое вероятнее всего осуществляется через фосфатазу PP2A, осуществляющую активирующее дефосфорилирование FoxO (Nho and Hergert, 2014). Динамика деградации FoxO в E1A-экспрессирующих линиях mERas и HEK239 согласуется с динамикой уровня экспрессии E1A и также демонстрирует вклад стабилизирующего действия E1A в экспрессию FoxO в E1A+Ras-трансформированных клетках.

ВЫВОДЫ

1. Длительная обработка E1A+Ras-трансформированных клеток бутиратом натрия приводит к деградации FoxO1, которая сопровождается нарастанием количества внутриклеточных активных форм кислорода
2. Для E1A-экспрессирующих клеток характерен более высокий исходный уровень экспрессии FoxO, который снижается при действии ингибиторов гистоновых деацетилаз
3. Экспрессия и активность FoxO увеличивается при действии ингибиторов гистоновых деацетилаз в опухолевых клетках HCT-116 и A-549, неэкспрессирующих E1A
4. Ингибирование деацетилаз гистонов увеличивает активность транскрипционных факторов FoxO со временем в клетках, где E1A не экспрессируется, тогда как в E1A-экспрессирующих клетках происходит только кратковременный подъем активности FoxO
5. Снижение экспрессии FoxO в E1A+Ras-трансформированных клетках при действии ингибиторов гистоновых деацетилаз обусловлено деградацией стабилизирующего белка E1A и активацией негативного регулятора FoxO киназы Akt

Исполнитель: _____ / Моршнева А.В.

Руководитель: _____ / Иготти М.В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пospelova, T.B., Kислякова, T.B., Медведев, A.B., Светликова, C.B., and Пospelov, B.A. (1990). Особенности трансформированного фенотипа и экспрессия индикаторных CAT-плазмид в эмбриональных фибробластах крысы, immortalized E1Aad5-онкогеном и трансформированных E1A+ cHa-ras онкогенами. Цитология. 32, 148.
2. Abou-Zeid, L., El-Mowafy, A., Eikel, D., Nau, H., and Elmazar, M. (2007). Mechanism of butyrate binding to histone deacetylase (HDAC): A new pharmacologic approach for predicting ligand cytotoxicity and safety profiles.
3. Abramova, M. V., Pospelova, T. V., Nikulenkova, F.P., Hollander, C.M., Fornace, A.J., and Pospelov, V.A. (2006). G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of β -catenin. J. Biol. Chem. 281, 21040–21051.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th Edition.
5. Angelis, E., Zhao, P., Zhang, R., Goldhaber, J.I., and Maclellan, W.R. (2011). The role of E2F-1 and downstream target genes in mediating ischemia/reperfusion injury in vivo. J. Mol. Cell. Cardiol. 51, 919–926.
6. Beharry, A.W., Sandesara, P.B., Roberts, B.M., Ferreira, L.F., Senf, S.M., and Judge, A.R. (2014). HDAC1 activates FoxO and is both sufficient and required for skeletal muscle atrophy. J. Cell Sci. 127, 1441–1453.
7. Berk, A.J. (1986). Functions of adenovirus E1A. Cancer Surv. 5, 367–387.
8. Berk, A.J. (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. Oncogene 24, 7673–7685.
9. Bowman, G.D., and Poirier, M.G. (2015). Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. Chem. Rev. 115, 2274–2295.
10. Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., et al. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. Science 303, 2011–2015.
11. Calnan, D.R., and Brunet, A. (2008). The FoxO code. Oncogene 27, 2276–2288.
12. Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. J. Mol. Biol. 319, 1097–1113.
13. Fallarino, F., Bianchi, R., Orabona, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Serreze, D.

- V, Grohmann, U., and Puccetti, P. (2004). CTLA-4-Ig activates forkhead transcription factors and protects dendritic cells from oxidative stress in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* *200*, 1051–1062.
14. Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* *425*, 475–479.
15. Gille, H., and Downward, J. (1999). Multiple Ras effector pathways contribute to G1 cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* *274*, 22033–22040.
16. Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., and Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* *363*, 15–23.
17. Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* *24*, 7410–7425.
18. Gregoret, I., Lee, Y.-M., and Goodson, H. V (2004). Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *J. Mol. Biol.* *338*, 17–31.
19. Hannenhalli, S., and Kaestner, K.H. (2009). The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 233–240.
20. Hariharan, N., Maejima, Y., Nakae, J., Paik, J., Depinho, R.A., and Sadoshima, J. (2010). Deacetylation of FoxO by Sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes. *Circ. Res.* *107*, 1470–1482.
21. Van Der Heide, L.P., and Smidt, M.P. (2005). Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 81–86.
22. Hu, M.C.T., Lee, D.F., Xia, W., Golfman, L.S., Ou-Yang, F., Yang, J.Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., et al. (2004). IκB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* *117*, 225–237.
23. Huang, H., and Tindall, D.J. (2007). Dynamic FoxO transcription factors. *J. Cell Sci.* *120*, 2479–2487.
24. Huang, H., Regan, K.M., Wang, F., Wang, D., Smith, D.I., van Deursen, J.M.A., and Tindall, D.J. (2005). Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 1649–1654.
25. Hwangbo, D.S., Gershman, B., Tu, M.-P., Palmer, M., and Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* *429*, 562–566.
26. Kaestner, K., Knochel, W., and Martinez, D. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* *14*, 142–146.
27. Khan, O., and La Thangue, N.B. (2011). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging

- mechanisms and clinical applications. *Immunol. Cell Biol.* 90, 85.
28. Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K., and Miyajima, A. (1995). Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene* 10, 2207–2212.
 29. Klotz, L., Sánchez-ramos, C., Prieto-arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., and Monsalve, M. (2015). Redox Biology Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* 6, 51–72.
 30. Kouzarides, T. (2018). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705.
 31. Lane, A.A., and Chabner, B.A. (2009). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 27, 5459–5468.
 32. Lowe, S.W., and Ruley, H.E. (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* 7, 535–545.
 33. Lu, Q., Zhai, Y., Cheng, Q., Liu, Y., Gao, X., Zhang, T., Wei, Y., Zhang, F., and Yin, X.X. (2013). The Akt-FoxO3a-manganese superoxide dismutase pathway is involved in the regulation of oxidative stress in diabetic nephropathy. *Exp. Physiol.* 98, 934–945.
 34. Madhusudan, S., Multicenter, A., Gene, P.I., Clinical, T., Ovarian, E., Overexpressing, C., Oncogene, H., Cancer, C., and Frisch, S.M. (2004). E1A as a Tumor Suppressor Gene. *10*, 1–4.
 35. Mariño-Ramírez, L., Kann, M.G., Shoemaker, B.A., and Landsman, D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev. Proteomics* 2, 719–729.
 36. Morgan, M.J., and Liu, Z. (2010). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Nat. Publ. Gr.* 21, 103–115.
 37. Nho, R.S., and Hergert, P. (2014). FoxO3a and disease progression. *World J. Biol. Chem.* 5, 346–354.
 38. Nowak, K., Killmer, K., Gessner, C., and Lutz, W. (2007). E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1769, 244–252.
 39. Obsil, T., and Obsilova, V. (2008). Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene* 27, 2263–2275.
 40. Oh, S.-Y., Sohn, Y.-W., Park, J.-W., Park, H.-J., Jeon, H.-M., Kim, T.-K., Lee, J.-S., Jung, J.-E., Jin, X., Chung, Y.G., et al. (2007). Selective cell death of oncogenic Akt-transduced brain cancer cells by etoposide through reactive oxygen species mediated damage. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2178–2187.
 41. Olmos, Y., Sánchez-Gómez, F.J., Wild, B., García-Quintans, N., Cabezudo, S., Lamas, S., and Monsalve, M. (2013). SirT1 Regulation of Antioxidant Genes Is Dependent on the Formation of a FoxO3a/PGC-1 α Complex. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1507–1521.
 42. Paik, J.H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner,

- J.W., Carrasco, D.R., et al. (2007). FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell* 128, 309–323.
43. Pelka, P., Ablack, J.N.G., Torchia, J., Turnell, A.S., Grand, R.J.A., and Mymryk, J.S. (2009). Transcriptional control by adenovirus E1A conserved region 3 via p300/CBP. *Nucleic Acids Res.* 37, 1095–1106.
 44. Prior, I. a, Lewis, P.D., and Mattos, C. (2012). UKPMC Funders Group UKPMC Funders Group Author Manuscript A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 72, 2457–2467.
 45. Protacio, R.U., Li, G., Lowary, P.T., and Widom, J. (2000). Effects of Histone Tail Domains on the Rate of Transcriptional Elongation through a Nucleosome. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8866–8878.
 46. Romanov, V.S., Abramova, M. V, Svetlikova, S.B., Bykova, T. V, Zubova, S.G., Aksenov, N.D., Fornace, A.J., Pospelova, T. V, and Pospelov, V.A. (2010). p21 Waf1 is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. *Cell Cycle* 9, 3945–3955.
 47. Rosen, K., Rak, J., Leung, T., Dean, N.M., Kerbel, R.S., and Filmus, J. (2000). Activated ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix: A mechanism of ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 149, 447–455.
 48. Sealy, L., and Chalkley, R. (1978). The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* 14, 115–121.
 49. Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2001). Identification of Components of the Murine Histone Deacetylase 6 Complex: Link between Acetylation and Ubiquitination Signaling Pathways. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8035–8044.
 50. Seonane, J., Le, H.-V., and Massague, J. (2002). Cell culture Myc suppression of the p21 Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729–734.
 51. Shankar, S., Chen, Q., and Srivastava, R.K. (2008). Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways act synergistically to enhance antiangiogenic effects of EGCG through activation of FOXO transcription factor. *J. Mol. Signal.* 3, 1–11.
 52. Singhal, G., Leo, E., Setty, S.K.G., Pommier, Y., and Thimmapaya, B. (2013). Adenovirus E1A Oncogene Induces Rereplication of Cellular DNA and Alters DNA Replication Dynamics. *J. Virol.* 87, 8767–8778.
 53. Su, J.L., Cheng, X., Yamaguchi, H., Chang, Y.W., Hou, C.F., Lee, D.F., Ko, H.W., Hua, K.T., Wang, Y.N., Hsiao, M., et al. (2011). FOXO3a-dependent mechanism of E1A-induced

- chemosensitization. *Cancer Res.* *71*, 6878–6887.
54. Takashima, a, and Faller, D. (2013). NIH Public Access Published in final edited form as: Expert Opin Ther Targets Targeting the RAS oncogene. *Expert Opin. Ther. Targets* *17*, 507–531.
 55. Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A., and Harel-Bellan, A. (2001). Histone acetylation and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 728–736.
 56. Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J.J., DiStefano, P.S., Chiang, L.W., and Greenberg, M.E. (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* *296*, 530–534.
 57. Urbánek, P., and Klotz, L.O. (2017). Posttranscriptional regulation of FOXO expression: microRNAs and beyond. *Br. J. Pharmacol.* *174*, 1514–1532.
 58. Velcich, A., and Ziff, E. (1988). Adenovirus E1a ras cooperation activity is separate from its positive and negative transcription regulatory functions. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 2177–2183.
 59. Voet, D., Voet, J.G., and Pratt, C.W. (2006). "Fundamentals of Biochemistry-Life At The Molecular Level (Hoboken, NJ: Wiley).
 60. Wacker, A. (2016). An introduction to the concept of slope (Springer Science & Business Media).
 61. Wang, F., Chan, C.H., Chen, K., Guan, X., Lin, H.K., and Tong, Q. (2012). Deacetylation of FOXO3 by SIRT1 or SIRT2 leads to Skp2-mediated FOXO3 ubiquitination and degradation. *Oncogene* *31*, 1546–1557.
 62. Wang, F., Marshall, C.B., and Ikura, M. (2015). Forkhead followed by disordered tail: The intrinsically disordered regions of FOXO3a. *Intrinsically Disord. Proteins* *3*, e1056906.
 63. Wang, M., Zhang, X., Zhao, H., Wang, Q., and Pan, Y. (2009). FoxO gene family evolution in vertebrates. *BMC Evol. Biol.* *9*, 1–15.
 64. Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E., and Jackle, H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* *57*, 645–658.
 65. Weinberg, R.A. (2013). *The Biology of Cancer_2nd edition*.
 66. Xu, W.S., Parmigiani, R.B., and Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* *26*, 5541.
 67. Yang, X., Li, C.J., Wan, Y., Smith, P., Shang, G., and Cui, Q. (2014). Antioxidative fullerol promotes osteogenesis of human adipose-derived stem cells. *Int. J. Nanomedicine* *9*, 4023–4031.
 68. Zhu, W.L., Tong, H., Teh, J.T., and Wang, M. (2015). Forkhead Box Protein O3 Transcription Factor Negatively Regulates Autophagy in Human Cancer Cells by Inhibiting Forkhead Box

БЛАГОДАРНОСТИ

В заключение, я хочу выразить благодарность своему научному руководителю, Марии Вячеславовне Иготти, за терпеливое руководство моей научной деятельностью, а также за ценные советы и комментарии, помощь и доброжелательное отношение.

Также за поддержку данной работы и интерес к проводимым мною исследованиям я благодарна заведующему лабораторией Молекулярных основ дифференцировки клеток Валерию Анатольевичу Поспелову.

Безусловно, хочется поблагодарить Светлану Борисовну Светликову за помощь в работе с клеточными культурами, отзывчивость и неравнодушное отношение. Кроме того, я благодарна всем сотрудникам лаборатории МОДК за создание дружественной рабочей атмосферы и готовность помочь.

Отдельную благодарность хочется выразить Алёне Гнединой за обучение основным лабораторным методам, отзывчивость и поддержку.

Также я не могу не поблагодарить преподавателей и сотрудников кафедры цитологии и гистологии СПбГУ за предоставление актуальных знаний и поддержку данной работы.